

朱颖,陈瑜,唐俊,等.田螺科4种代表性贝类基因组调研及SSR特征分析[J].江苏农业科学,2023,51(6):40-47.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2023.06.006

田螺科4种代表性贝类基因组调研及SSR特征分析

朱颖,陈瑜,唐俊,季秋婷,王俊杰,唐伯平,王刚

(盐城师范学院湿地学院/江苏省盐土生物资源研究重点实验室,江苏盐城 224007)

摘要:田螺科贝类是淡水软体动物的重要物种,在生态方面具有重要作用,并具有较高的经济价值,但目前田螺科物种参考基因组缺乏。本研究选取田螺科中华园田螺、铜锈环棱螺、多棱角螺、涓公螺等代表性贝类,基于Illumina测序数据,对4个贝类基因组大小、重复序列和杂合度等基因组特征,采用K-mer法进行预测。使用SOAPdenovo软件对4种贝类进行初步组装,用MISA进行SSR分子标记鉴定和特征分析。结果表明,4种田螺科贝类基因组大小分别为1 353、896、991、1 196 Mb,杂合度分别为0.77%、1.37%、2.41%、0.91%,重复序列比例分别为26.2%、26.7%、27.8%、28.8%,基因组的GC含量分别约为33.4%、33.7%、33.1%、33.8%。说明这4个田螺科贝类杂合较高、重复序列较低。基因组初步组装结果显示,4种贝类基因组相对K-mer评估结果偏大,但GC含量及测序深度与K-mer结果较为一致。根据SSR特征分析,在田螺科4个贝类基因组序列中分别鉴定到928 562、824 342、739 299、739 407个SSR,其中,在单核苷酸至六核苷酸重复序列类型中A/T、AC/GT、AAT/ATT、AGAT/ATCT、ATAAT/ATTAT、CTAACC/GGTTAG占比最高,其中长度为10~24 bp的SSR分别占69.7%、64.9%、68.4%、70.2%。本研究为田螺科4个代表性物种基因组精细图谱构建提供了参考,同时为SSR分子标记开发和田螺科物种资源保护和利用提供了分子依据。

关键词:田螺科;贝类;基因组评估;SSR;杂合率;基因组大小

中图分类号:Q789 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2023)06-0040-07

田螺科(Viviparidae)贝类是我国淡水水域常见的软体动物,其属于腹足纲、中腹足目,广泛分布于湖泊、沼泽、水库、池塘及溪流等处^[1],能对水体健康起到维持作用,净化水体,是重要的生态指示物种^[2]。田螺科物种多为经济贝类,其营养价值高,螺肉鲜美,是低脂肪、高蛋白食品,在我国广受欢迎,同时也是家禽、水产养殖鱼类、虾蟹类的天然饲料^[3]。田螺科贝类属于世界物种,我国包含9个属,70多个种,其中河螺属(*Rivularia*)和螺蛳属(*Margarya*)为特有属,环棱螺属和圆田螺属物种最为常见^[4]。随着资源环境的破坏和对田螺的需求日益增加,加上外来淡水螺的不断入侵,我国本土田螺科物种分布和数量受到严重威胁,很多种群在数量上明显衰退,严重的已濒临灭绝^[5]。基于田螺科物种的重要生态价值和经济价值,保护和恢复田

螺科物种的多样性及种群数量的问题显得尤为重要。

随着组学时代的到来和发展,测序成本下降,高通量测序被广泛用于软体动物基因组测序中。在软体动物中,首个贝类——太平洋牡蛎(*Pacific oyster*)基因组图谱于2012年完成,标志着软体动物组学时代的到来,填补了软体动物家族基因组图谱的空白^[6]。随后,霸王莲花青螺(*Lottia gigantea*)^[7]、章鱼(*Octopus bimaculoides*)^[8]、牡蛎(*Crassostrea virginica*)^[9]等其他软体动物的基因组图谱陆续发表,这为其他软体动物的基因组图谱的构建提供了基础。截至2022年6月,在NCBI数据库中已公布92个软体动物基因组图谱。基因组的解析可为贝类优良性状基因挖掘、遗传机制解析提供研究基础。然而,目前淡水的田螺科贝类分子生物学研究基础相对薄弱,关于田螺科的研究大多集中在初步调查、系统发育和分类地位等方面的分析^[10-12]。在NCBI数据库中,提供的田螺科分子数据十分有限,缺乏田螺科贝类参考基因组信息。在构建基因组精细图谱之前进行基因组特征调研,可为后续的测序方案提供参考依据。目前,主要采用K-mer分析方法对基因组进行调研评估获取物种

收稿日期:2022-10-04

基金项目:国家自然科学基金(编号:32270487);江苏省社会发展重点研发计划(编号:BE2020673)。

作者简介:朱颖(2002—),女,江苏盐城人,主要研究软体动物类基因组。E-mail:HappyPigzhuyin@outlook.com。

通信作者:王刚,博士,讲师,主要从事分子进化生物学研究。E-mail:baiwang0708@163.com。

杂合率、重复度等信息^[13-15]。本研究选取淡水田螺科的中华园田螺(*Cipangopaludina cathayensis*)、铜锈环棱螺(*Bellamya aeruginosa*)、多棱角螺(*Angulyagra polyzonata*)、湄公螺(*Mekongia rivularia*)等 4 种代表性贝类进行基因组调研,通过 K-mer 分析,进行物种杂合率、基因组重复序列比例及基因组大小的评估,以期为田螺科贝类基因组学研究提供参考。同时,利用 Illumina 测序数据对 4 个田螺科贝类进行初步组装和初步比较分析,采用 MISA 工具对简单重复序列(SSR)进行鉴定和分析,为进一步分子标记开发和资源鉴定提供研究基础。

1 材料与方法

1.1 材料

中华园田螺、铜锈环棱螺、多棱角螺和湄公螺,于 2021 年 5—6 月分别采集自四川(30°23′36.82″N, 104°4′50.46″E)、江苏盐城(33°22′33.4″N, 120°12′7.19″E)、湖南(27°49′36.25″N, 113°7′59.75″E)、江西(28°30′7.34″N, 115°48′22.93″E),采集的田螺科样本保存于江苏盐城师范学院沿海滩涂重点实验室。

1.2 样品 DNA 提取

在江苏省盐城师范学院沿海滩涂重点实验室,使用 Omega 公司的试剂盒 D3373-01 Mollusc DNA Kit(50)提取田螺科 4 种代表性螺的基因组 DNA(取螺的部分样品),用 NanoDrop 光谱仪测定 DNA 的浓度和纯度。DNA 样本标准为:DNA 总量 $\geq 20 \mu\text{g}$ 且浓度 $\geq 300 \text{ ng}/\mu\text{L}$;样本纯度要求为: $D_{260 \text{ nm}/280 \text{ nm}} \geq 1.8$, $D_{260 \text{ nm}/230 \text{ nm}} \geq 1.8$ 。

1.3 4 种贝类样本测序和基因组评估

DNA 样本送到武汉菲沙基因信息有限公司进行文库制备,基于高通量测序仪(MGI-SEQ2000)平台采取双端 150 bp (PE150)技术进行测序,测得的数据经过质控后用来进行下一步数据分析。4 种贝类 Illumina 测序数据存储在国家基因组科学数据中心数据库(<https://ngdc.cncb.ac.cn/>),项目编号:PRJCA013294。

文库构建参照 Illumina 标准规程^[16],构建并插入片段大小为 270 bp 的文库^[17]并测序。完成构建的文库在 Illumina HiSeq 2500 平台进行测序。选用 AdapterRemoval (version 2.1.7)软件对测序数据去接头,用 FastQC 软件进行质量评估,并过滤质粒污染。采用基于 K-mer 分析进行估算,K 值取 21,在

测序 reads 均匀分布的前提下,计算基因组大小(基因组大小 = 总碱基数/平均测序深度 = 总 K-mer 数平均值/平均 K-mer 深度)。利用 Jellyfish 和 GenomeScope 软件对 K-mer 频数分布数据进行统计并拟合作图,得到 K-mer 分布图。

1.4 基因组组装和 GC 深度分析

对过滤数据利用 SOAPdenovo 软件进行基因组组装,将读长(reads)分成 100 bp 长度的 K-mer,再基于 K-mer 数据构建 de Bruijn 图。利用 perl 脚本对组装的基因组进行滑窗统计,设置窗口为 10 kb,根据 GC 分布和覆盖深度统计结果,应用 R 脚本绘制散点图。

1.5 简单重复序列(SSR)特征分析

对初步完成组装的基因组进行简单重复序列分析。使用微卫星识别工具(microsatellite identification tool, MISA)搜索 SSR 位点对于 150 bp 以上的序列片段(Scaffolds)^[18]。同时运行 MISA 软件程序的配置文件 misa.ini,使用 MISA 默认参数。

2 结果与分析

2.1 田螺科 4 种贝类基因组测序质量和基因组大小评估

对 Illumina Hiseq PE 测序平台测得的中华园田螺、铜锈环棱螺、多棱角螺、湄公螺等 4 个代表性贝类的原始数据,经过滤和校正等质控步骤后,分别获得 52.59、58.64、55.71、54.90 G 的有效数据,有效数据均大于 96%(表 1)。测序质量评估结果显示,4 种螺的 Q20 分别为 96.5%、96.1%、96.4%、96.6%,Q30 分别为 88.5%、87.5%、88.3%、88.8%,Q20 均大于 95%,Q30 均大于 85%,表明 4 种贝类的测序质量较好,满足分析要求。4 种田螺科贝类 GC 含量分别为 33.4%、33.7%、33.1%、33.8%,GC 含量基本持平。

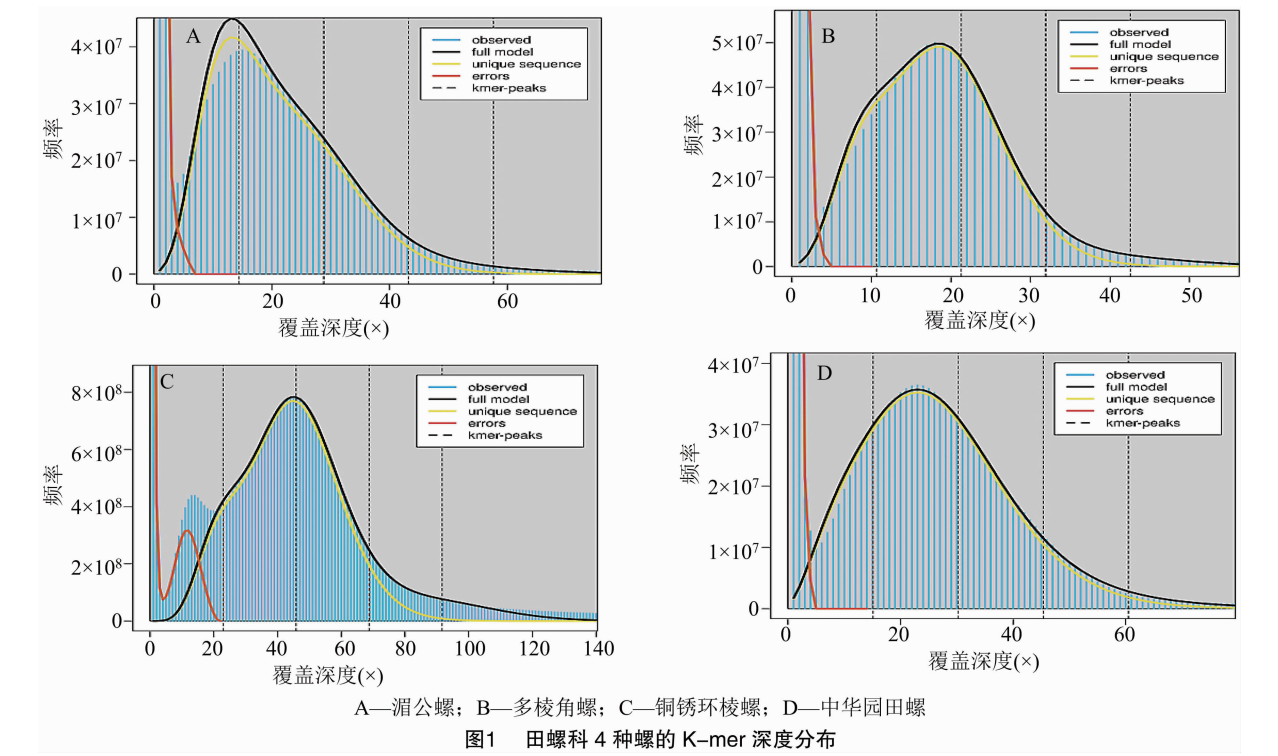
本研究采用 K-mer 的分析方法,取 K 为 21 来进行物种基因组特征分析,K-mer 分布图如图 1,实际观测的 K-mer 分布为蓝色区域;测序频数较低的 K-mer 为红色线条下方区域(测序错误);黑色线条下方是可靠的 K-mer 数据,用于 4 种贝类基因组大小的评估;黄色线条下方区域是非重复区域。由图 1 可知,中华园田螺、铜锈环棱螺、多棱角螺、湄公螺的主峰分别在测序深度 $18 \times$ 、 $18 \times$ 、 $45 \times$ 、 $23 \times$ 左右,均只有 1 个主峰,说明 4 种螺均为 2 倍体。在测序数据中去除深度异常的 K-mer 后,

评估得到 4 种螺的基因组大小分别为 1 353、896、991、1 196 Mb；杂合度分别为 0.77%、1.37%、2.41%、0.91%。4 种贝类杂合率均大于 0.5%，为

高杂合基因组。4 种螺的重复序列比例分别为 26.2%、26.7%、27.8%、28.8%，比例基本一致（表 2）。

表 1 田螺科 4 种螺基因组调查测序结果统计

物种	原始数据 (G)	过滤后数据 (G)	有效率 (%)	Q20 (%)	Q30 (%)	G + C 含量 (%)
中华园田螺	54.75	52.59	96.06	96.5	88.5	33.4
铜锈环棱螺	59.72	58.64	98.19	96.1	87.5	33.7
多棱角螺	57.78	55.71	96.42	96.4	88.3	33.1
湄公螺	56.03	54.90	97.99	96.6	88.8	33.8



A—湄公螺；B—多棱角螺；C—铜锈环棱螺；D—中华园田螺

图1 田螺科 4 种螺的 K-mer 深度分布

表 2 田螺科 4 种螺基因组评估结果

物种	基因组 大小 (Mb)	杂合率 (%)	重复序列 比例 (%)	重复序列 长度 (Mb)	非重复 序列长度 (Mb)
中华园田螺	1 353	0.77	26.2	355	985
铜锈环棱螺	896	1.37	26.7	239	656
多棱角螺	991	2.41	27.8	276	710
湄公螺	1 196	0.91	28.8	344	848

2.2 田螺科 4 种贝类基因组序列初步组装

利用 SOAPdenovo 软件分别对 4 种贝类经过质控处理后得到的高质量 read,进行初步组装,中华园田螺、铜锈环棱螺、多棱角螺、湄公螺的基因组大小分别为 1 598、1 845、1 202、1 322 Mb,其中铜锈环棱

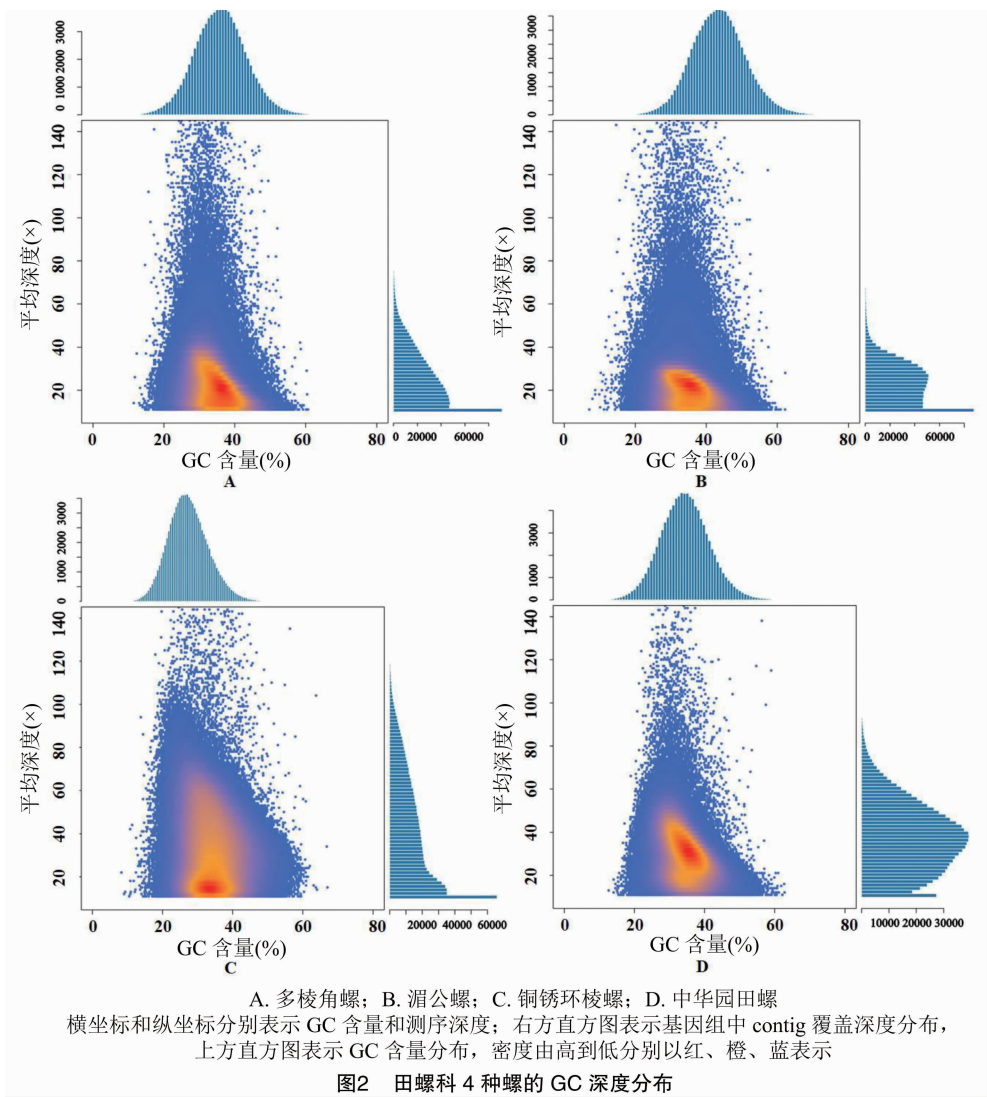
螺基因组长度最大,多棱角螺基因组长度最小。4 种贝类的 Contigs N50 分别为 690、200、1 025、889 bp（表 3）。初步组装得到的基因组大小与 K-mer 评估得到基因组大小有差异,其组装的基因组大小偏大,这可能杂合度有关,也有可能与二代测序数据读长较短和覆盖度较低等因素有关。

2.3 田螺科 4 种贝类初步组装的 GC 含量与覆盖度分布

对 4 种田螺科贝类初步组装得到的基因组,过滤覆盖深度 10 × 以下的 contig 序列,基于覆盖深度和 GC 含量绘制成散点图。由图 2 可知,中华园田螺、铜锈环棱螺、多棱角螺、湄公螺 4 种螺的 GC 含量较为一致,在 27% ~ 43% 范围内,但区域测序深

表 3 田螺科 4 种螺组装基因组序列统计结果

物种	总条数	总基因大小 (Mb)	N50 (bp)	N90 (bp)	最长序列 (bp)
中华园田螺	4 67 910	1 598	690	2 140	25 163
铜锈环棱螺	9 417 731	1 845	200	106	19 879
多棱角螺	2 126 880	1 202	1 025	205	36 163
湄公螺	3 198 506	1 322	889	147	33 984



度分布有所差异。其中中华园田螺测序深度较高, 在 20 ~ 40 × 区域深度分布比较集中, 其次分别是湄公螺(18 ~ 25 ×)、多棱角螺(10 ~ 38 ×)、铜锈环棱螺(10 ~ 20 ×)。4 种田螺科贝类均为 1 个主峰, 说明无外源污染。

2.4 田螺科 4 种贝类 SSR 特征分析

对中华园田螺、铜锈环棱螺、多棱角螺、湄公螺等 4 种贝类初步组装的基因组, 通过微卫星识别工

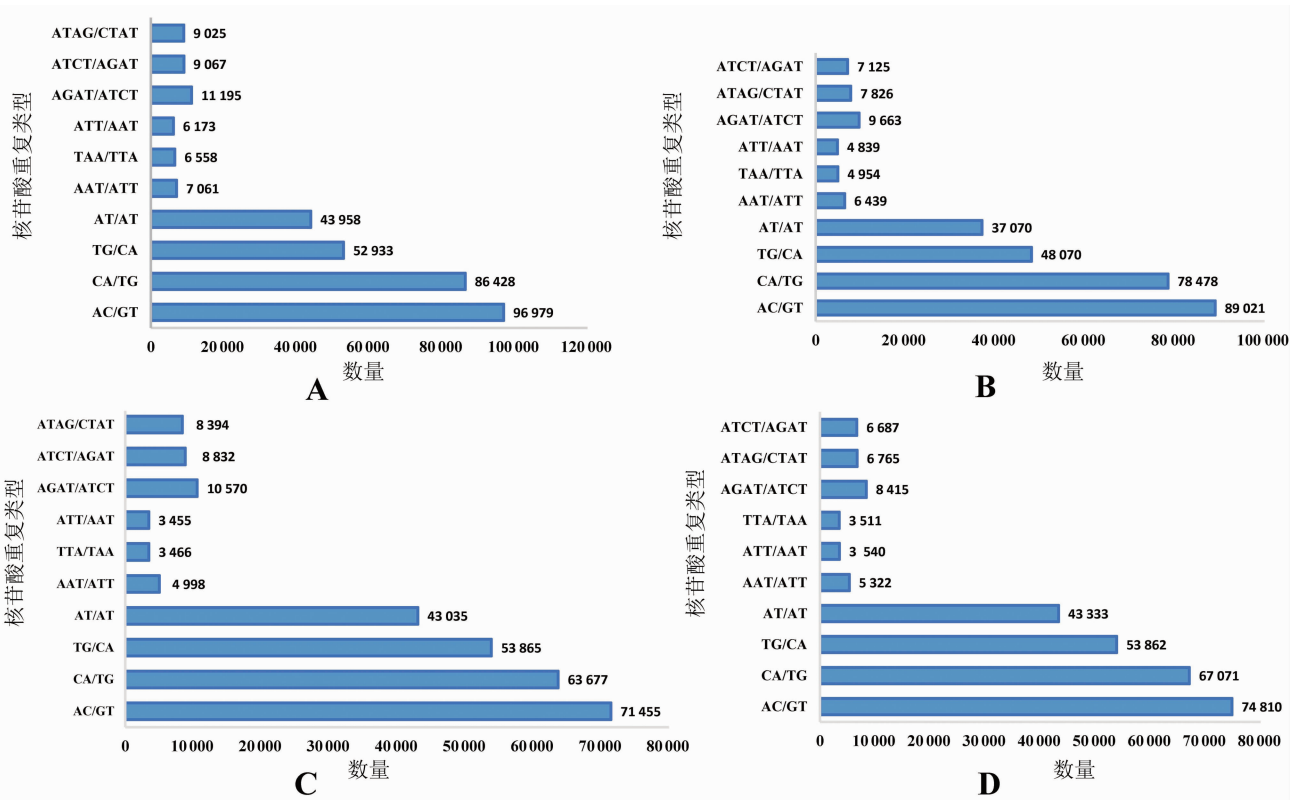
具 MISA 软件对组装基因组的 Scaffolds 进行 SSR 分析。4 种贝类总共分别搜索到 928 562、824 342、739 299、739 407 个 SSR。其中, 4 种贝类分别有 196 158、127 288、158 667、160 694 条序列包含 1 个以上碱基重复; 分别有 13 360、127 897、118 293、118 258 个复合形式存在。4 种贝类 SSR 位点的核苷酸重复类型可划分 6 种类型。其中, 单核苷酸重复的 SSR 基元类型最丰富, 五核苷酸重复、六核苷

酸重复基元类型和分布相对较少。具体而言,中华园田螺、铜锈环棱螺、多棱角螺、湄公螺的单核苷酸重复、双核核苷酸重复序列占比最高,分别达 79.2%、79.9%、78.7%、80.9%(表 4)。对检测出的重复基元进行排序,其中,4 种贝类优势重复基元

分别是 A/T、AC/GT、AAT/ATT、AGAT/ATCT、ATAAT/ATTAT、CTAACC/GGTTAA。对双核苷酸重复、三核苷酸重复、四核苷酸重复中基元进行比较发现,4 种贝类的优势重复基元大体相同(图 3)。

表 4 田螺科 4 种螺基因组 SSR 类型

项目	中华园田螺	铜锈环棱螺	多棱角螺	湄公螺
检测的序列总数	2 662 879	4 774 187	2 126 880	2 004 233
检测序列大小(bp)	1 413 025 131	1 299 951 955	1 201 522 286	1 184 855 841
已识别的 SSR 总数	928 562	824 342	739 299	739 407
包含 SSR 的序列数量	636 900	657 552	470 107	470 109
包含 1 个以上 SSR 的序列数	196 158	127 288	158 667	160 694
复合形式存在的 SSR 数量	13 360	127 897	118 293	118 258
单核苷酸重复的数量	294 267	258 955	216 003	224 884
双核苷酸重复的数量	441 329	399 380	365 951	372 993
三核苷酸重复的数量	83 807	72 651	58 170	58 522
四核苷酸重复的数量	106 960	90 959	96 476	80 388
五核苷酸重复的数量	1 893	1 860	2 461	2 387
六核苷酸重复的数量	306	537	238	233
单核苷酸重复序列比例(%)	31.7	31.4	29.2	30.4
双核苷酸重复序列比例(%)	47.5	48.4	49.5	50.4
SSR 长度在 10 ~ 24 bp 之间的比例(%)	69.7	64.9	68.4	70.2



A—中华园田螺；B—铜锈环棱螺；C—多棱角螺；D—湄公螺

图3 田螺科 4 种螺主要核苷酸重复基序统计

3 结论与讨论

近年来,随着测序技术的发展,越来越多的软体动物基因组被解析,为研究软体动物起源、进化、生殖、发育、性别调控和免疫等问题提供分子生物学基础。目前基因组调研的主要手段是高通量二代测序技术。本研究通过 Illumina 数据,利用生物信息学手段,首次对腹足纲淡水软体动物田螺科贝类中华园田螺、铜锈环棱螺、多棱角螺、湄公螺等代表性物种的基因组大小、杂合度进行评估分析。4 种贝类的基因组大小分别为 1 353、896、991、1 196 Mb,说明田螺科物种基因组大小存在差异,但与已公布大多数腹足纲物种的基因组大小接近^[19-21]。腹足纲软体动物基因组大小存在丰富的多样性,如在已测腹足纲中,基因组最大的物种是地中海芋螺 (*Conus ventricosus*),基因组大小为 3.6 G;霸王莲花青螺 (*Lottia gigantea*) 基因组最小 (359.5 Mb)^[8],这 2 个物种基因组大小差异约为 10 倍。基因组是反映生物物种遗传信息的重要指标,在物种进化和适应中起着重要作用,其大小与生物参数有关,如细胞大小、抗逆性和个体生长等。在本研究中,田螺科贝类生长个体大小与基因组大小没有直接的相关性。

前人将一个物种杂合度高于 0.5% 定义为高杂合度物种^[22],在本研究中,中华园田螺、铜锈环棱螺、多棱角螺、湄公螺 4 种贝类的杂合度分别约 0.77%、1.35%、2.41%、0.91%,均大于 0.5%,说明这 4 种田螺科贝类是高杂合率物种,这可能与田螺科物种的特殊性有关。田螺科贝类属于雌雄异体,且生境基本相同,不同种群间基因交流可能是造成杂合率高的原因之一。这在 Wang 等应用线粒体基因组构建系统发育树的研究中有所显示^[23],说明田螺科存在着种间基因交流,而部分种间是否存在生殖隔离还存在争议,需要进一步研究。实践证明,高杂合度基因组会导致组装过程中同源区域的 read 无法合并,分支结构过多,连续性降低,从而造成组装的基因组偏大。在本研究中也存在这样的问题,应用二代测序数据从头组装结果大小均高于应用 K-mer 评估的结果。另外,高杂合还导致组装结果中 Contig N50 较小,造成 GC 平均深度及分布较小。以上结果说明高杂合度提高了对田螺科物种精细基因图谱的构建难度。在本研究中 4 个田螺科物种重复序列占全基因组较小,分别为

26.2%、26.7%、27.8%、28.8%,与已发表的其他腹足纲物种接近^[24-26],为低重复序列基因组(重复序列比例高于 50% 是高重复基因组)^[27],但非洲大蜗牛 (*Achatina fulica*) 例外,其重复序列比例较大,占整个基因组的 70%,前人研究发现其发生基因组复制事件^[28]。本研究 4 个田螺科贝类基因组重复序列占比较小,推测较少发生全基因组复制事件。

物种 GC 比例是评估、分析物种调研图准确度,评估后续基因组图谱组装难度的重点衡量标准之一^[29]。在本研究中,田螺科 4 种贝类的 GC 含量分别为 33.4%、33.7%、33.1%、33.8%,腹足纲其他物种 GC 含量在 26.8%~45.5% 的区间内,其中绿唇鲍 (*Haliotis laevigata*) GC 含量最小 (26.8%)^[30],印度洋热液喷口蜗牛 (*Alviniconcha marisindica*) 最大 (GC 含量为 45.5%)^[31]。事实上腹足纲物种线粒体基因组中也有存在 GC 含量较低的规律,如福寿螺 (*Pomacea canaliculata*)、斑点果瓶螺 (*P. maculata*) 和皱纹盘鲍 (*Haliotis discus hannai*) 的线粒体 GC 含量在 33%~40% 范围内^[32],说明腹足纲物种核基因组和线粒体基因组均具有 AT 偏好性。研究发现物种在基因组图谱构建中,过高或过低的 GC 含量将导致测序错误,GC 贫乏或富集区通常会引起扩增效果较差,并影响组装数据的准确性^[33],且对准确度的干扰高于完整性。这也是本研究 4 个贝类物种中基因组初步组装质量较差,以及其他贝类基因组序列组装难度较高的因素之一^[34]。

SSR 分子标记具有多态性高、等位差异显著的优点^[35],是遗传研究中应用广泛的分子标记^[36-37]。本研究利用 MISA 分析方法对田螺科代表性 4 种螺进行 SSR 特征分析,与植物的 SSR 主要是双核苷酸和三核苷酸不同^[22],本研究 4 种贝类中单、双核苷酸重复序列占比最高,分别达 79.2%、79.9%、78.7%、80.9%,这与扁玉螺 (*Neverita didyma*)^[35]、泥东风螺 (*Babylonia lutosus*)^[38] 的研究结果相一致。从 4 种田螺科贝类的 SSR 重复基元来看,单核苷酸中 SSR 位点占比最多的为 A/T,双核苷酸重复基元中,AC/GT 占比均最高,这与前人研究的结果^[39]相一致。SSR 的长度会影响其本身多态性,而 4 种螺所含 SSR 的长度绝大部分在 10~24 bp 之间的,分别占 71.4%、64.9%、68.4%、70.2%,推测田螺科物种可能受到强烈的趋同选择压力。本研究为田螺科物种基因图谱构建、物种分子鉴定提供了前期基础。

参考文献:

- [1] 刘月英, 张文珍, 王耀先. 中国田螺科的地理分布 [C]// 齐钟彦. 中国动物学会、中国海洋湖沼学会贝类学分会第四次代表大会暨第五次学术讨论会论文集. 青岛, 1991: 16–24.
- [2] 朱鹏飞, 雷留萍, 李德亮. 环棱螺与河蚬摄食率、滤水率及对小球藻清除率研究 [J]. 水生生态学杂志, 2019, 40(5): 63–67.
- [3] 罗 辉, 陈李婷, 敬庭森, 等. 田螺科 4 种螺的肌肉主要营养成分 [J]. 水产学报, 2020, 10(19): 1–8.
- [4] Huang X C, Rong J, Liu Y, et al. the complete maternally and paternally inherited mitochondrial genomes of the endangered freshwater mussel *Solenia carinatus* (Bivalvia: Unionidae) and implications for unionidae taxonomy [J]. PLoS One, 2013, 8(12): e84352.
- [5] 黄晓燕, 王丽珍. 5 种螺蛳属动物和中国圆田螺 *COI* 基因序列分析 [J]. 水生生态学杂志, 2008(5), 106–108.
- [6] Zhang G F, Fang X D, Guo X M, et al. The oyster genome reveals stress adaptation and complexity of shell formation [J]. Nature, 2012, 490(7418): 49–54.
- [7] Albertin C B, Simakov O, Mitros T, et al. The octopus genome and the evolution of cephalopod neural and morphological novelties [J]. Nature, 2015, 524(7564): 220–224.
- [8] Simakov O, Marletaz F, Cho S J, et al. Insights into bilaterian evolution from three spiralian genomes [J]. Nature, 2013, 493(7433): 526–531.
- [9] Chiari M G, Warren W C, Guo X M, et al. Developing tools for the study of molluscan immunity: the sequencing of the genome of the eastern oyster, *Crassostrea virginica* [J]. Fish and Shellfish Immunology, 2015, 46(1): 2–4.
- [10] 王炬光. 基于底栖动物的海河流域河流生态健康评价及 9 种田螺系统发育研究 [D]. 武汉: 华中农业大学, 2017.
- [11] 田 明, 范 彪, 杨瑜玲, 等. 螺蛳分子系统发育的初步研究 [J]. 昆明医科大学学报, 2015, 36(3): 33–48.
- [12] 杜丽娜, 杨君兴, Von R T, 等. 中国特有腹足类——螺蛳属 (*Margarya*) 的系统发育学 [J]. 科学通报, 2013, 58(16): 1483–1491.
- [13] 于福来, 黄 梅, 张影波, 等. 裸花紫珠基因组调研及 SSR 特征分析 [J]. 中国中药杂志, 2019, 44(18): 3974–3978.
- [14] Temnykh S, DeClerck G, Lukashova A, et al. Computational and experimental analysis of microsatellites in rice (*Oryza sativa* L.): frequency, length variation, transposon associations, and genetic marker potential [J]. Genome Res, 2001, 11(8): 41–52.
- [15] Ding X P, Mei W L, Huang S Z, et al. Genome survey sequencing for the characterization of genetic background of *Dracaena cambodiana* and its defense response during dragon's blood formation [J]. PLoS One, 2018, 13(12): e0209258.
- [16] Cloonan N, Forrest A, Kolle G, et al. Stem cell transcriptome profiling via massive – scale mRNA sequencing [J]. Nature Methods, 2008(7): 613–619.
- [17] 陈双双, 齐香玉, 冯 景, 等. 基于流式细胞术和基因组 Survey 的绣球基因组大小及特征分析 [J]. 江苏农业科学, 2021, 49(12): 39–44.
- [18] Beier S, Thiel T, Münch T, et al. MISA – web; a web server for microsatellite prediction [J]. Bioinformatics, 2017(16): 2583–2585.
- [19] Cai H M, Li Q Y, Fang X D, et al. A draft genome assembly of the solar – powered sea slug *Elysia chlorotica* [J]. Scientific Data, 2019, 6(1): 190022.
- [20] Renaut S, Davide G, Hoeh W R, et al. Genome survey of the freshwater mussel *Venustaconcha ellipsiformis* (Bivalvia: Unionida) using a hybrid de novo assembly Approach [J]. Genome Biology and Evolution, 2018, 10(7): 1637–1646.
- [21] Masonbrink R E, Purcell C M, Boles S E, et al. An annotated genome for *Haliotis rufescens* (red abalone) and resequenced green, pink, pinto, black, and white abalone species [J]. Genome Biology and Evolution, 2019, 11(2): 431–438.
- [22] 伍艳芳, 肖复明, 徐海宁, 等. 樟树全基因组调查 [J]. 植物遗传资源学报, 2014, 15(1): 149–152.
- [23] Wang J G, Zhang D, Jakovlic I, et al. Sequencing of the complete mitochondrial genomes of eight freshwater snail species exposes pervasive paraphyly within the Viviparidae family (Caenogastropoda) [J]. PLoS One, 2017, 12(7): e0181699.
- [24] Sun J, Mu H, Ip J, et al. Signatures of divergence, invasiveness and terrestrialization revealed by four apple snail genomes [J]. Molecular Biology and Evolution, 2019, 36(7): 1507–1520.
- [25] Simakov O, Marletaz F, Cho S J, et al. Insights into bilaterian evolution from three spiralian genomes [J]. Nature Publishing Group, 2013, 493(7433): 526–531.
- [26] Choo L Q, Bal T M P, Choquet M, et al. Novel genomic resources for shelled pteropods: a draft genome and target capture probes for *Limacina bulimoides*, tested for cross – species relevance [J]. BMC Genomics, 2020, 21(1): 11–25.
- [27] Edwards M A, Henry R J. DNA sequencing methods contributing to new directions in cereal research [J]. Elsevier, 2011(3): 395–400.
- [28] Guo Y H, Zhang Y, Liu Q, et al. A chromosomal – level genome assembly for the giant African snail *Achatina fulica* [J]. Gigascience, 2019, 8(10): giz124.
- [29] 戚行江, 任海英, 梁森苗, 等. 杨梅全基因组测序结果初报 [J]. 浙江农业科学, 2015, 56(10): 1564–1566.
- [30] Botwright N A, Zhao M, Wang T F, et al. Greenlip abalone (*Haliotis laevigata*) genome and protein analysis provides insights into maturation and spawning [J]. G3, 2019, 9(10): 3067–3078.
- [31] Yang Y, Sun J, Chen C, et al. Metagenomic and metatranscriptomic analyses reveal minor – yet – crucial roles of gut microbiome in deep – sea hydrothermal vent snail [J]. Anim Microbiome, 2022, 4(1): 3–20.
- [32] Liu C H, Zhang Y, Ren Y W, et al. The genome of the golden apple snail *Pomacea canaliculata* provides insight into stress tolerance and invasive adaptation [J]. Gigascience, 2018, 7(9): 1–13.

赵 圆,张艳芳,杨 帆,等. 基于形态标记和 AFLP 标记的山药种质资源遗传多样性分析[J]. 江苏农业科学,2023,51(6):47-54.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2023.06.007

基于形态标记和 AFLP 标记的山药种质资源遗传多样性分析

赵 圆,张艳芳,杨 帆,赵令敏,陈 妍,霍秀文

(内蒙古农业大学园艺与植物保护学院/内蒙古自治区野生特有蔬菜种质资源与种质创新重点实验室,内蒙古呼和浩特 010019)

摘要:为研究山药种质资源的遗传多样性及亲缘关系,采用 AFLP 分子标记结合形态标记的方法,对 60 份山药种质资源进行遗传多样性分析。结果表明,60 份山药种质资源形态性状间具有较高的多样性,遗传多样性指数最高的是叶形,变异系数最大的是块茎质量;通过聚类分析计算出欧氏距离在 1.081 6~11.425 9 之间,当遗传距离为 8.18 时可将供试材料分为两大类。筛选出的 26 对 AFLP 引物组合扩增出多态性条带 580 条,平均多态率 78.44%;Nei's 基因多样性指数平均值为 0.198 8;Shannon 信息指数平均值为 0.314 9,表明供试山药种质有较高的遗传多样性;遗传相似系数在 0.619~0.922,在遗传相似系数为 0.74 时,可将 60 份山药种质分为 2 个类群和 2 个单独分支,结果表明,不同地区来源的山药种质在聚类图中没有明显界限。部分供试材料的形态标记与 AFLP 标记聚类结果具有一致性,但也存在一定差异。山药种质资源遗传多样性丰富,将形态学与分子标记结合能有效鉴别种质资源及其亲缘关系。

关键词:山药;形态标记;AFLP 分子标记;遗传多样性

中图分类号:S632.102.4 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2023)06-0047-08

山药(*Dioscorea opposita* Thunb.)为合目薯蓣科薯蓣属,具备双子叶特征特性的单子叶缠绕草质藤本植物,无性繁殖。山药的主要产品器官为子叶下胚轴膨大形成的地下块茎,其地下块茎形状呈长圆柱形,垂直生长^[1]。山药是纯天然的滋补保健食品,含有多营养物质,可食用,也可药用,有调节脾胃、增强免疫、延缓衰老等效果,是世界上重要的

十大食用块茎类植物之一^[2]。我国是山药重要的原产地之一,在长期栽培过程中,因其适应性强、种植范围广,使得地区间相互引种,但山药的体外培养和遗传转化方案尚未建立,导致山药原有遗传基础已无法准确溯源,种质资源混乱,仅通过简单形态学标记很难真实反映品种间的遗传背景和亲缘关系,分类鉴定难度大,不利于山药产业的健康快速发展^[3]。

以 DNA 为基础的分子标记是鉴定种质资源差异性最直接有效的遗传分析方法,不受基因表达和地理环境的影响。其中,AFLP 是基于 PCR 开发且效率很高的标记技术,只需少量纯化的 DNA,具有重复性好、稳定性强、灵敏度高等优点,极大地加快了育种进程^[4]。许云等通过 AFLP 分子标记分析了

收稿日期:2022-03-24

基金项目:国家自然科学基金(编号:31860558);内蒙古自治区科技计划项目(编号:2020GG0044)。

作者简介:赵 圆(1998—),女,内蒙古呼和浩特人,硕士,从事蔬菜种质资源和生物技术等研究工作。E-mail:1518576512@qq.com。

通信作者:霍秀文,博士,教授,博士生导师,从事蔬菜种质资源和生物技术等研究工作。E-mail:huoxiuwen@imau.edu.cn。

[33] Aird D, Ross M G, Chen W S, et al. Analyzing and minimizing PCR amplification bias in Illumina sequencing libraries [J]. *Genome Biology*, 2011, 12(2): 1-14.

[34] 张永德,文露婷,罗洪林,等. 卵形鲳鲹基因组调研及其 SSR 分子标记的开发应用 [J]. *南方农业学报*, 2020, 51(5): 983-994.

[35] 卢玮筱,陈永霞,祁鹏志. 扁玉螺转录组 SSR 信息分析 [J]. *浙江海洋大学学报(自然科学版)*, 2018, 37(3): 215-220.

[36] Hung K H, Chiang T Y, Chui C T, et al. Isolation and characterization of microsatellite loci from a potential biofuel plant

Miscanthus sinensis (Poaceae) [J]. *Conservation Genetics*, 2008, 9(6): 1377-1380.

[37] Ma K H, Kim N S, Lee G A, et al. Development of SSR markers for studies of diversity in the genus *Fagopyrum* [J]. *Theoretical and Applied Genetics*, 2009, 119(7): 1247-1254.

[38] 熊 钢,王晓清,王 佩,等. 泥东风螺 EST-SSR 开发及其群体遗传多样性分析 [J]. *渔业科学进展*, 2020, 41(4): 117-124.

[39] 曾 聪,高泽霞,罗 伟,等. 基于 454GS FLX 高通量测序的团头鲂 ESTs 中微卫星特征分析 [J]. *水生生物学报*, 2013, 37(5): 982-988.